

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 739 988 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
30.10.1996 Patentblatt 1996/44

(51) Int. Cl.⁶: C12Q 1/68, C12P 19/34,
C07H 21/04

(21) Anmeldenummer: 96106728.7

(22) Anmeldetag: 29.04.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IE IT LI NL SE

(72) Erfinder:
• Heidrich, Björn
10783 Berlin (DE)
• Robinson, Peter-Nicholas, Dr.
10629 Berlin (DE)
• Tiecke, Frank
13057 Berlin (DE)
• Rolfs, Arndt, Dr.
10999 Berlin (DE)

(30) Priorität: 29.04.1995 DE 19515891

(71) Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
68298 Mannheim (DE)

(54) **Verfahren zur Gattungs- und speziesspezifische Identifizierung von Legionellen**

(57) Verfahren zur gattungsspezifischen Amplifikation von Legionellen und gattungsspezifische oder speziesspezifische Identifizierung.

EP 0 739 988 A1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung Legionella und Verfahren zum gattungs- und speziesspezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella sowie dafür geeigneter Reagenzien.

5 Legionellen sind aquatische, ubiquitäre gramnegative aerobe, fakultativ intrazelluläre stäbchenförmige Bakterien. Die Familie Legionellaceae besteht aus einer Gattung (Legionella) mit derzeit 48 bekannten Spezies und 51 Serogruppen. Von der wichtigsten Spezies *L. pneumophila* existieren 16 bekannte Serovare. Unter ihnen wichtigsten Reservieren sind Wasserleitungen, Klimaanlagen und Kühltürme. Die Infektion des Menschen erfolgt über legionellenhaltige 10 Aerosole. Die Legionellose tritt häufig als Epidemie, z. B. über Duschköpfe aus Warmwasseranlagen, kontaminiertes Kühlwasser in Klimaanlagen, oder sporadisch auf. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bisher nicht beschrieben.

15 Legionellen-Infektionen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die Legionärskrankheit, eine akute, schwere, oft mit hohem Fieber, abdominellen Beschwerden, Kopfschmerzen, Myalgien und Verwirrtheitszuständen und anderen neurologischen Symptomen einhergehende atypische Pneumonie sowie das Pontiac-Fieber, eine mit grippeähnlichen Symptomen verlaufende selbstlimitierende Variante der Legionellose.

20 Die wichtigste Serogruppe von *L. pneumophila*, ist *L. pneumophila* Serogruppe 1 (L. pn. Sero. 1) als dem mit ca. 80 % häufigsten Erreger der Legionärskrankheit. Es existieren aber große regionale Unterschiede, insbesondere bei den nosokomial erworbenen Legionellosen. Im Gegensatz dazu werden bei Pontiac-Fieber überwiegend *L. micdadei* und andere Non-Pneumophila-Spezies als kausales Agens beschrieben.

25 Die Labordiagnostik der Legionellen ist schwierig. Legionellen können nur schlecht mit Fuchsin angefärbt werden, so daß man die Erreger mit der Gram-Färbung praktisch nicht darstellen kann. Legionellen wachsen nicht auf üblichen Kulturmedien, sondern nur auf Spezialnährböden und einer Atmosphäre, die 2,5 - 5 % CO₂ enthält. Die Sensitivität der Kultur ist nur ca. 20 % für *L. pneumophila* und ca. 5 % für andere Spezies.

30 Zum Nachweis von Legionellen wurden unter anderem DNS-DNS-Hybridisierungen, Pulsfeld-Elektrophorese, Ribotyping, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, Fettsäure- und Ubichinon-Analysen, rRNS-Sequenzierung, RT-PCR und Southern Blot, Latex-Agglutination, Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie, indirekte Immunfluoreszenz und Kohlenhydratutilisation (BIOLOG-System) angewandt.

35 In Med. Microbiol. Lett. 1994; 3: 279-290 und Clin. Lab. 1994; 40: 211-216 ist die Sequenzierung von 5S-rDNS von Legionellen beschrieben.

40 Auf dem Markt ist ein Kit zum Nachweis von Legionellen in Wasserproben erhältlich. Bei einem Nachweisverfahren mit Hilfe dieses Kits wird in einem ersten Schritt ein Fragment der 5S-rDNS genusspezifisch amplifiziert. In demselben Gefäß wird ein Fragment des MIP-Gens der Spezies *L. pneumophila* amplifiziert. Der Kit enthält insgesamt 7 Primer zur Durchführung einer sogenannten Multiplex-PCR unter Herstellung zweier PCR-Amplifikate. Anschließend erfolgt die Detektion der Amplifikate durch Reverse Dot Blot. Das in diesem Kit realisierte Verfahren ist wegen der Notwendigkeit des Einsatzes einer großen Anzahl von Primern komplex und in der Herstellung aufwendig. Darüber hinaus ist das bekannte Verfahren im Hinblick auf die Sensitivität unbefriedigend.

45 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Reagenzien, die den Nachweis von Legionellen einfacher gestalten und die weniger Komponenten beinhalten. Eine weitere Aufgabe war es, spezifischere und potentiell variabliere Legionellen-nachweise zur Verfügung zu stellen.

50 Gegenstand der Erfindung ist daher in einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung Legionella, in dem mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung Legionella amplifiziert werden.

55 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Nachweisverfahren unter Verwendung des oben genannten Amplifikationsverfahrens.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist.

60 Kern der Erfindung ist, daß Sequenzen auf dem Legionella-Genom lokalisiert wurden, die das Entwerfen von Nukleinsäuresonden erlauben, die zum Nachweis aller bislang den Legionellen zugeordneten Spezies der Gattung Legionella verwendet werden können.

65 Unter Amplifikation wird die Erhöhung der Konzentration der in einem Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleinsäuren oder Teilen davon verstanden. Beispiele für solche Amplifikationsverfahren sind die Polymerase-Kettenreaktion gemäß EP-B-0 201 184, das sogenannte NASBA-Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 sowie davon abgeleitete Verfahren.

70 Bei dem Verfahren der EP-A-0 201 184 wird die zu amplifizierende Nukleinsäure, die einzelsträngig vorliegt oder einzelsträngig gemacht wird, mit einem molaren Überschuß zweier Oligonukleotid-Primer unter Hybridisierungsbedingungen und in Gegenwart eines induzierenden Agens für die Polymerisation und Nukleotiden behandelt, wobei die Primer so gewählt werden, daß für jeden Strang ein zum Nukleinsäurestrang komplementäres Verlängerungsprodukt des

betreffenden Primers synthetisiert wird, und daß ein Verlängerungsprodukt eines Primers, wenn es von seinem Komplement getrennt ist, als Matrize zur Synthese eines Verlängerungsprodukts des anderen Primers dienen kann, Trennen der Verlängerungsprodukte von den Matrizen, an denen sie synthetisiert wurden, und Verwendung der gebildeten Verlängerungsprodukte zur erneuten Umsetzung mit den Primern. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte ergibt sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung einer Nukleinsäuresequenz, die innerhalb der äußeren Hybridisierungspositionen der Primer liegt.

Bei dem Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 wird eine Primerkonstruktion zur Erzeugung einer doppelsträngigen Nukleinsäure verwendet, in der die zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz funktionell an einen Promotor gebunden ist. Hierzu weist einer der Primer mindestens einen Strang einer Promotorregion auf. Der intermediär gebildete Transkriptionskomplex wird Bedingungen unterworfen, unter denen unter der Kontrolle des Promotors Ribonukleinsäuren unter Verwendung der zu amplifizierenden Nukleinsäure als Matrize gebildet werden. Die gebildeten Ribonukleinsäuren werden erneut zur Bildung jeweils eines neuen transkribierbaren Nukleinsäurekomplexes verwendet. Ein Vorteil dieses Systems ist, daß es isotherm geführt werden kann.

Unter Multiplex-PCR wird ein Verfahren gemäß EP-A-0 364 255 verstanden. Nach diesem Verfahren werden in einer Eintopfreaktion durch geeignete Anordnung der Hybridisierungspositionen einer Vielzahl von Primern bestimmte Fragmente von Nukleinsäuren amplifiziert, die meist unterschiedliche Länge und Position im Genom aufweisen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press, 1986, insbesondere in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Edt. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, insbesondere 2.9.1 - 2.9.10 und Molecular Cloning, Edt. J. Sambrook et al., CSH, 1989, insbesondere 9.4.7 - 9.5.8, Bezug genommen. Dazu gehören insbesondere die bekannten Methoden zur Herstellung von markierten Nukleosidtriphosphaten, wie sie auch in EP-A-0 329 474 beschrieben sind, die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden, die Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsenzymen, die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt, sowie die Bildung von Nukleinsäuren aus Nukleosidtriphosphaten mit Hilfe von Polymerasen, gegebenenfalls unter Verwendung von sogenannten Primern.

Eine Markierung im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise radioaktive (^{32}P), farbige oder fluoreszierende Gruppen oder Metallatome. Indirekt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie Antikörper, Antigene, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch aktive Teilenzyme. Diese werden in einer nachfolgenden Reaktion oder Reaktionssequenz detektiert. Besonders bevorzugt sind Haptene, da mit ihnen markierte Nukleosidtriphosphate (rNTP oder dNTP) im allgemeinen besonders gut als Substrate von (RNS- bzw. DNS-) Polymerasen einsetzbar sind und eine anschließende Reaktion mit einem markierten Antikörper gegen das Hapton oder das hapenisierte Nukleosid leicht vorgenommen werden kann. Solche Nukleosidtriphosphate sind beispielsweise Brom-Nukleosidtriphosphate oder Digoxigenin-, Digoxin- oder Fluorescein-gekoppelte Nukleosidtriphosphate. Als besonders geeignet haben sich die in EP-A-0 324 474 genannten Steroide und deren Detektion erwiesen. Für deren Inkorporation in Nukleinsäuren wird hiermit auf die EP-A-0 324 474 verwiesen.

Unter den Nukleinsäuren, die zur Verwendung des erfindungsgemäßen Amplifikations- und Nachweisverfahrens für Legionellen verwendet werden können, werden insbesondere genomische Nukleinsäuren verstanden. Genomische Nukleinsäuren enthalten unter anderem auch die Gene, welche für die ribosomale RNS (rRNS) codieren, sowie eine Reihe von Spacersequenzen. Diese werden nach der Größe der rRNS, für die sie codieren, benannt. In Legionellen-45 genomen sind in dieser Reihenfolge das 16S-rRNS-Gen, das 23S-rRNS-Gen und das 5S-rRNS-Gen angeordnet. Diese Gene sind durch sogenannte Spacerregionen voneinander getrennt.

SEQ. ID. NO. 1 offenbart eine Nukleotidsequenz, die Ähnlichkeiten mit der in Spezies der Gattung Legionella enthaltenen genomischen Sequenz aufweist, die aneinander angrenzende Bereiche der 23S-rRNS, der Spacerregion zwischen 5S-rRNS- und 23S-rRNS- und des 5S-rRNS-Bereiches einschließt. Die SEQ. ID. NO. 1 schließt nur einen relativ kleinen Teil der 23S-rRNS jedoch die vollständige Spacerregion und ca. 80 % der 5S-rRNS ein.

SEQ. ID. NO. 1 stellt eine Nukleotidsequenz dar, aus welcher Teilsequenzen entnommen werden können, die gatungsspezifisch für Legionella sind.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung soll der Begriff Nukleinsäuresonde nicht im Hinblick auf die Funktion einschränkend betrachtet werden. Die oben genannten Eigenschaften sind maßgebend. Insbesondere sollen zu den Nukleinsäuresonden auch die sogenannten Probes oder Nachweissonden gezählt werden, deren Hybridisierung mit den in der Probe vorhandenen Legionellenukleinsäuren als Maß für die Anwesenheit des Bakteriums nachgewiesen werden kann. Dazu kann die Nukleinsäuresonde bevorzugt weitere Teile enthalten, die den Nachweis oder die Amplifikation nicht wesentlich nachteilig beeinflussen. Zu solchen Molekülteilen gehören beispielsweise Markierungen zum Nachweis der Sonden, bzw. Hybriden, die diese Sonde enthalten, Gruppen, welche eine Immobilisierung der Nuklein-

EP 0 739 988 A1

säuresonde an eine feste Phase erlauben, feste Phasen als solche (z. B. Beads oder Oberflächen, z. B. von Reagenz- oder Detektionsgefäßern) oder weitere, nicht mit Legionella-Sequenzen interferierende Nukleotidsequenzen. Die Ausgestaltung der Nukleinsäuresonde richtet sich daher insbesondere nach der Art, wie der Nachweis der Legionella-Nukleinsäuren geführt werden soll.

5 Unter einer Nukleinsäuresonde wird ein Molekül mit einer festgelegten Aufeinanderfolge von Basen verstanden, welches in der Lage ist, mit natürlichen Nukleinsäuren Hybride aufgrund von Basen-Basen-Wechselwirkungen zu bilden. Hierzu gehören natürliche und artifizielle Nukleinsäuren. Die artifiziellen Nukleinsäuren unterscheiden sich von den natürlichen Nukleinsäuren dadurch, daß sie entweder im Basenteil (z. B. durch Verwendung von Basenanaloga, z. B. 7-deaza-dGTP) oder im Grundgerüst (Ersatz der Zucker- oder/und Phosphateinheiten durch andere chemische 10 Molekülteile, z. B. Peptide) modifiziert sind. Derartige künstliche Nukleinsäuren sind beispielsweise auch die in WO 92/20702 beschriebenen Peptidnukleinsäuren (PNA). Wesentlich für die korrekte Funktionsweise der Nukleinsäuresonden ist die spezifische Basenpaarung, wodurch die Selektivität der Sonden erreicht wird. Besonders bevorzugt besteht eine Nukleinsäuresonde aus Desoxyribonukleinsäure (DNA).

15 Unter einer Nukleinsäuresonde werden auch die sogenannten Primer verstanden, welche nach Hybridisierung mit Legionella-Nukleinsäuren unter Verwendung eines Enzyms verlängert werden können. Typische Verlängerungsreaktionen sind beispielsweise die Anhängung von Mononukleosidtriphosphateinheiten durch DNA-Polymerasen (z. B. E. coli DNA-Polymerase, Klenow-Fragment oder *Thermus aquaticus*-Polymerase) unter Verwendung der Legionella-Nukleinsäuren als Matrize. In diesem Fall wird mit den bislang bekannten Enzymen das 3'-Ende des Primers verlängert. Eine weitere Verlängerungsreaktion ist die Ligase-Reaktion, bei der die Nukleinsäuresonde mit einem weiteren 20 Oligonukleotid enzymatisch verknüpft wird (z. B. EP-A-0 320 308). Zwischen der Polymerase- und der Ligasereaktion sind Mischformen bekannt (z. B. WO 90/01069).

25 Unter einer für Legionella gattungsspezifischen Nukleinsäuresonde wird eine Nukleinsäure verstanden, die mit einer Nukleinsäure hybridisiert, die eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ. ID. NO. 1 bzw. deren Komplement enthält, oder die mit allen der in Tabelle 1 genannten Legionellenspezies unter denselben Stringenzbedingungen hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisieren diese Nukleinsäuren mit allen möglichen Spezies der Gattung Legionella.

Die gattungsspezifischen Sequenzen liegen bei der Sequenz der FIG I bevorzugt im 23S- und/oder 5S-Bereich; wenngleich es bei geschickter Wahl der Hybridisierungsbedingungen auch möglich ist, gattungsspezifische Sonden auch im Spacer-Bereich zu entwerfen.

30

35

40

45

50

55

Tab. 1

Erwartete Amplifikatlängen 23S-5S-Spacer-Region bei Verwendung von Primerpaar B/D

| | Species/ Scrogroup | ATCC No. (NCTC) | Stamm | Amplikonalänge/ komplette bestimmte Länge der Sequenz | EMBL Accession Number | SEQ ID. NO. |
|-----|-------------------------------|--------------------|----------------|---|-----------------------------|-------------------|
| 5 | <i>L. pneumophila</i> sero 1 | 33152 | Philadelphia-1 | 232bp/336bp | Z30431 | 26 |
| 10 | <i>L. pneumophila</i> sero 1 | 33153 | Knoxville-1 | 232bp/336bp | Z30432 | 27 |
| 15 | <i>L. pneumophila</i> sero 1 | 43108 | Benidorm 030E | 232bp/336bp | Z30433 | 28 |
| 20 | <i>L. pneumophila</i> sero 1 | 43112 | France 5811 | 232bp/336bp | Z30534 | 29 |
| 25 | <i>L. pneumophila</i> sero 1 | 43109 | OLDA | 232bp/336bp | Z30434 | 30 |
| 30 | <i>L. pneumophila</i> sero 1 | 43110 | Oxford 4032E | 231bp/335bp | Z30435 | 31 |
| 35 | <i>L. pneumophila</i> sero 1 | 43113 | Camperdown-1 | 232bp/336bp | Z30435 | 32 |
| 40 | <i>L. pneumophila</i> sero 2 | 33154 | Togus-1 | 232bp/336bp | Z30437 | 33 |
| 45 | <i>L. pneumophila</i> sero 3 | 33155 | Bloomington-2 | 232bp/336bp | Z30438 | 34 |
| 50 | <i>L. pneumophila</i> sero 4 | 33156 | Los Angeles-1 | 232bp/336bp | Z30439 | 35 |
| 55 | <i>L. pneumophila</i> sero 4 | n.a. | Portland | 232bp/336bp | Z30440 | 36 |
| 60 | <i>L. pneumophila</i> sero 5 | 33216 | Dallas-1E | 232bp/336bp | Z30441 | 37 |
| 65 | <i>L. pneumophila</i> sero 5 | (11417) | Cambridge-2 | 232bp/336bp | Z30442 | 38 |
| 70 | <i>L. pneumophila</i> sero 6 | 33215 | Chicago-2 | 232bp/336bp | Z30443 | 39 |
| 75 | <i>L. pneumophila</i> sero 7 | 33823 | Chicago-8 | 232bp/336bp | Z30444 | 40 |
| 80 | <i>L. pneumophila</i> sero 8 | 35096 | Concord-3 | 232bp/336bp | Z30445 | 41 |
| 85 | <i>L. pneumophila</i> sero 9 | 35289 | IN-23-G1-C2 | 232bp/336bp | Z30446 | 42 |
| 90 | <i>L. pneumophila</i> sero 10 | 43283 | Leiden-1 | 232bp/336bp | Z30447 | 43 |
| 95 | <i>L. pneumophila</i> sero 11 | 43130 | 797-PA-H | 232bp/336bp | Z30448 | 44 |
| 100 | <i>L. pneumophila</i> sero 12 | 43290 | 570-CO-H | 232bp/336bp | Z30449 | 45 |
| 105 | <i>L. pneumophila</i> sero 13 | 43736 | 82 A 3105 | 232bp/336bp | Z30450 | 46 |
| 110 | <i>L. pneumophila</i> sero 14 | 43073 | 1169-MN-H | 232bp/336bp | Z30451 | 47 |
| 115 | <i>L. anisa</i> | 35292 | WA-316-C3 | 267bp/371bp | Z30535 | 48 |
| 120 | <i>L. brunensis</i> | n.a. | n.a. | 246bp/350bp | Z30536 | 49 |
| 125 | <i>L. cherrii</i> | 35252 | ORW | 258bp/362bp | Z30537 | 50 |
| 130 | <i>L. cincinnatensis</i> | 43753 | 72-OH-H | 213bp/317bp | Z30452 | 51 |
| 135 | <i>L. dumoffii</i> | 33279 | NY-23 | 255bp/359bp | Z30538 | 52 |
| 140 | <i>L. erythra</i> | 35303 | SE-32A-C8 | 201bp/325bp | Z30453 | 53 |
| 145 | <i>L. feeleii</i> sero 1 | 35072 | WO-44C | 238bp/342bp | Z30454 | 54 |
| 150 | <i>L. feeleii</i> sero 2 | 35849 | 691-WI-H | 238bp/342bp | Z30455 | 55 |
| 155 | <i>L. israelensis</i> | 43119 | Bercovier-4 | 217bp/321bp | Z30583 | 56 |
| 160 | <i>L. jordanis</i> | 33623 | BL-540 | 244bp/348bp | Z30539 | 57 |
| 165 | <i>L. longbeachae</i> sero 1 | 33462 | Long Beach-4 | 208bp/312bp | Z30456 | 58 |
| 170 | <i>L. longbeachae</i> sero 2 | 33484 | Tucker-1 | 208bp/312bp | Z30465 | 59 |
| 175 | <i>L. maceachernii</i> | 35300 | PX-1-G2-E2 | 250bp/352bp | Z30461 | 60 |
| 180 | <i>L. mcdadei</i> | 33218 | Tatlock | 267bp/371bp | Z30460 | 61 |
| 185 | <i>L. moravica</i> | n.a. | 316-36 | 236bp/340bp | Z30457 | 62 |
| 190 | <i>L. oakridgensis</i> | 33761 | OR-10 | 197bp/302bp | Z30540 | 63 |
| 195 | <i>L. rubrilucens</i> | 35304 | WA-270A-C2 | 219bp/324bp | Z30458 | 64 |
| 200 | <i>L. sainthelensi</i> | 35248 | Mt St Helens-4 | 212bp/316bp | Z30459 | 65 |
| 205 | <i>L. spiritensis</i> | 35249 | Mt St Helens-9 | 246bp/350bp | Z30464 | 66 |
| 210 | <i>L. steigerwaltii</i> | 35302 | SC-18-C9 | 256bp/360bp | Z30463 | 67 |
| 215 | <i>L. wadsworthii</i> | 33877 | 81-716A | 262bp/366bp | Z30462 | 68 |

Unter speziespezifischen Nukleinsäuresonden werden Nukleinsäuren verstanden, die mit allen Serovaren einer Legionellaspezies unter denselben Stringensbedingungen hybridisieren. Solche Sonden sind mit ihrer Sequenz in Beispiel 3 wiedergegeben. Darunter befindet sich auch eine *L. pneumophila*-Speziessonde, die mit allen Serovaren der Spezies *pneumophila*, nicht jedoch mit den übrigen, in Tabelle 1 genannten, Spezies aus der Gattung *Legionella* hybridisiert.

EP 0 739 988 A1

Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung sind mindestens 15 Basen lang, besonders bevorzugt zwischen 23 und 40 Basen. Es handelt sich somit um Nukleinsäuren, welche auf einfache Weise durch chemische Synthese in sogenannten (Nukleinsäure-) Synthesizern hergestellt werden können. Sequenzen, die als gattungsspezifische Sequenz für Legionella zu gebrauchen sind, erhält man durch Aussuchen einer mindestens 15 Basen langen Sequenz aus SEQ. ID.NO. 1, wobei eine Abweichung in 1 oder 2 Basen der Gattungsspezifität in Abhängigkeit von den Hybridisierungsbedingungen in den meisten Fällen keinen Abbruch tun wird. Es ist selbstverständlich, daß die Anzahl der Abweichungen mit zunehmender Größe der Nukleinsäuresonde zunehmen kann. Erfindungsgemäß sind daher Sonden bevorzugt, die zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 sind oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 sind. Besonders bevorzugt sind Sonden, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz (in direkter Auffeinanderfolge) enthalten, die streng homolog oder streng komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist.

Die Gattungsspezifität könnte leiden, wenn die Sonde weitere Legionellaspezies-spezifische Sequenzen oder nicht-Legionella spezifische Sequenzen enthält, die eine zu spezifische bzw. zu unspezifische Hybridisierung bewirken würden. Bevorzugt sind weitere Legionella-spezifischen Sequenzen, sofern sie überhaupt vorliegen, nicht mehr als 15 Basen lang.

Des Weiteren kann eine Nukleinsäuresonde im Legionella-unspezifischen Teil funktionelle Nukleotidsequenzen, wie sie beispielsweise für Promotoren oder Origins of Replication charakteristisch sind, enthalten.

Innerhalb der SEQ. ID. NO. 1 sind bestimmte Bereiche zur Auswahl von gattungsspezifischen Sequenzen insbesondere für Nachweissonden besonders bevorzugt. Besonders bevorzugte Bereiche liegen zwischen den Positionen 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 sowie 307 und 286. Besonders bevorzugt schließt die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 268 bis 296 ein.

Das erfindungsgemäße Amplifikationsverfahren kommt im Gegensatz zum Stand der Technik mit weniger als 7 Primern aus. Dies ist beispielsweise möglich dadurch, daß als Primer eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonden benutzt werden. Ein Amplifikationsverfahren, welches mit nur einem Primer auskommt, wird schon dadurch realisiert, daß der Primer mit der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert, mit Mononukleosidtriphosphaten unter Einwirkung einer DNS-Polymerase verlängert wird, das Verlängerungsprodukt von der Matrizen Nukleinsäure getrennt und der obige Vorgang mit einem neuen Primer wiederholt wird. In jedem Zyklus wird daher pro Nukleinsäure ein Verlängerungsprodukt gebildet. Es handelt sich somit um ein lineares Amplifikationsverfahren. Exponentielle Amplifikation ist theoretisch beispielsweise dann erreichbar, wenn 2 Primer eingesetzt werden, welche die prinzipiellen Bedingungen, wie sie in der EP-A-0 201 184 beschrieben sind, erfüllen. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird ein weiteres Primerpaar eingesetzt, welches auf dem amplifizierten Nukleinsäurefragment zwischen den Hybridisierungspositionen des ersten Primerpaars hybridisiert. Diese Ausführungsform wird gelegentlich auch als "nested PCR" bezeichnet. Darin werden insgesamt 4 verschiedene Primer eingesetzt.

Auch bei den auf Transkriptionsreaktionen beruhenden Amplifikationsverfahren werden im allgemeinen Fall 2 Nukleinsäuresonden eingesetzt, die entweder auf gegenläufigen Strängen oder auf einem Strang der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert werden können.

Erfindungsgemäß handelt es sich für das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren bei allen als Primer fungierenden Nukleinsäuresonden um Legionella-gattungsspezifische Sonden. In einem besonders bevorzugten Fall hybridisiert einer der Primer mit einem Strang der Legionella-Nukleinsäure in der 23S-rDNS-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-rDNS-Region. Dadurch wird erreicht, daß das amplifizierte Teilstück der Nukleinsäuresequenz der Legionellen sowohl Teile der 23S-rDNS-Region, der 5S-rDNS-Region als auch der dazwischenliegenden Spacer-Region umfaßt. Zum Verständnis muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß sich die Amplifikate unterschiedlicher Spezies in der Sequenz unterscheiden, der zwischen den einander zugewandten Enden der ursprünglichen Primer liegt. Dabei handelt es sich eben bevorzugt um Sequenzen der Spacer-Region.

Das erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikationsverfahren kann für mehrere Zwecke benutzt werden. In einer ersten Möglichkeit (z. B. im Sinne eines Screenings) kann die Summe aller in der Probe vorliegenden Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen werden. Dies ist beispielsweise möglich, wenn die in der gattungsspezifischen Amplifikation erzeugten Amplifikate mit einer weiteren gattungsspezifischen (gewünschtenfalls nachweisbar markierten) Nukleinsäuresonde zur Hybridisierung gebracht und die gebildeten Hybride nachgewiesen werden. Dabei kann die Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) so gewählt werden, daß sie in den Bereichen nahe den ursprünglichen Primerhybridisierungsstellen hybridisiert, jedoch wird die Aussagekraft des gattungsspezifischen Nachweises dadurch noch erhöht, daß die Nukleinsäuresonde in dem zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer liegenden Bereich der Amplifikate hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisiert die gattungsspezifische Nachweissonde zwischen den Positionen 242 und 299 von SEQ. ID. NO. 1 und ist zwischen 25 und 35 Nukleotiden, besonders bevorzugt 26 bis 30 Nukleotiden lang. Mit der Veränderung der Länge der Sonde muß die Hybridisierungstemperatur entsprechend angepaßt werden. Die optimale gattungsspezifische Sonde hybridisiert zwischen den Positionen 268 und 296 und ist somit 29 Nukleotide lang.

Prinzipiell sind für den Nachweis der Amplifikate alle bekannten Nachweisformate verwendbar, beispielsweise Auftrennung nach Größe der Amplifikate (z. B. Gelelektrophorese) aber auch die Blot-Verfahren. Beispielsweise kann

schon aufgrund der Größenvariabilitäten der Spacer-Region eine Differenzierung von Non-Pneumophila-Spezies im einfachen, hochauflösenden Agarosegel durchgeführt werden, was im Sinne eines Screeningverfahrens eine rasche orientierende Information liefert. Auf einen Nachweis, der auf einem Hybridisierungsschritt mit einer Nachweissonde beruht, kann jedoch meist nicht verzichtet werden. Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung des Reverse-Dot-Blot-Formats erwiesen. Hierzu wird beispielsweise eine gattungsspezifische Nukleinsäuresonde auf einer Membran immobilisiert und anschließend das Produkt der Amplifikationsreaktion auf die immobilisierten Sonden gegeben. Dazu müssen die Amplifikate gegebenenfalls vorher einzelsträngig gemacht werden. Wenn während der Amplifikation markierte Mononukleosidtriphosphate eingebaut wurden, ist der Nachweis der über die Nukleinsäuresonde immobilisierten Amplifikate nach Abwaschen nicht gebundener Nukleinsäuren auf einfache Weise möglich. Ein solches Format ist beispielsweise in der EP-A-0 237 362 beschrieben. Auf den Inhalt dieser Patentanmeldung wird hiermit vollinhaltlich Bezug genommen.

Ein Nachweis ist jedoch auch über die sogenannten Sandwich-Verfahren möglich, bei denen neben der immobilisierten Nukleinsäuresonde eine weitere, markierte gattungsspezifische Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) eingesetzt wird, die mit den Amplifikaten an einer anderen Position hybridisiert als die Festphasen-gebundene Sonde. Dieses Verfahren ist prinzipiell in EP-B-0 079 139 beschrieben.

Das erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikationsverfahren ermöglicht jedoch auch den verlässlichen und unkomplizierten Nachweis von Legionella-Spezies (z. B. für den klinischen Routinealltag) oder Gemischen von Spezies (z. B. eine Unterscheidung von L-pneumophila von non-pneumophila). Für diesen Fall kann im Anschluß an das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren eine Hybridisierung mit einer (gewünschtenfalls markierten) speziespezifischen Sonde (Nachweissonde) durchgeführt werden, die im amplifizierten Bereich zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer hybridisiert. In SEQ. ID-Nos. 26 - 68 sind Sequenzen, aus welchen die speziespezifischen Sequenzen ausgewählt werden können, für einzelne Spezies angegeben. Die speziespezifischen Teile befinden sich insbesondere im Spacer-Bereich, der bevorzugt mittels der gattungsspezifischen Primer amplifiziert wird. Die Lage der Amplifikate (z. B. wie in Tabelle 1 angegeben) ergibt sich aus den Hybridisierungspositionen der Primer (in Tabelle 1 ist dies das Primerpaar B/D). Besonders bevorzugte speziespezifische Nachweissonden sind in Beispiel 3.7 angegeben.

Speziespezifische Nachweissonden, die auf diesen Spacersequenzen beruhen, sind bevorzugt länger als 15 bp und kleiner als die gesamte Spacerregion.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht daher den multiplen Nachweis von Legionella-Spezies unter Verwendung einer einzigen in einer vorgeschalteten gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion hergestellten Reaktionsmischung, die Amplifikate von Teilen der in der Probe anwesenden Legionella-Spezies enthält. Ein Vorteil der Erfindung ist daher, daß sie einen einfacheren, d. h. weniger komplexen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella ermöglicht.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist daher ein Paar von Primern zur Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren, von denen einer mit einem Strang der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure, enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-rDNS und 23S-rDNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-rDNS und 23S-rDNS, die im Genom direkt an die Spacerregion anschließen. Bevorzugt ist diese doppelsträngige Nukleinsäure höchstens 371 bp lang und ist das Produkt einer gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zum Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend mindestens eine Legionella-gattungsspezifische Nukleinsäure und mindestens eine Legionella-speziespezifische Sonde.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

Beispiel 1:

45

Bakteriengewinnung und Anzucht

Die hier verwendeten Legionellen "Type strains" wurden auf gepuffertem Hefe-Kohle-Extraktagar (P.H. Edelstein, Laboratory Diagnosis of infections caused by legionellae, Eur. J. Clin. Microbiol. Vol. 6, 1, 4-10 (1987)) unter Zusatz von α -Ketoglutarat bei einer Inkubationstemperatur von 35°C in feuchter CO₂-Atmosphäre für mindestens 3 Tage angezüchtet. Gram-Färbungen, Mikroskopie und Inkubation von Blut-Agar-Platten zeigten kein Wachstum anderer Bakterien. Die Legionellen wurden mit 3 ml bidestilliertem Wassers von den Platten geerntet und verdünnt, mit 12.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 μ l bidestilliertem Wasser resuspendiert. Logarithmische Verdünnungsreihen und Auszählen der Kolonien auf Agarplatten ergaben durchschnittlich 10^{10} KBE/ml.

55

Beispiel 2:

DNS-Aufschluß

5 Je ein 250 µl-Aliquot der jeweiligen Bakterienkultur wurde zur Freisetzung der DNS alkalisch lysiert (PCR: Clinical diagnostics and research; Springer Verlag Berlin/Heidelberg 1992, S. 79-80), indem 250 µl einer 200 mM NaOH-Lösung hinzugefügt, mit 100 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet und für 20 Minuten in einem auf 95°C vorgeheizten Thermomixer inkubiert wurden. Nach Schütteln und Zentrifugation wurden 32 µl Tris-HCl (pH 5,0) zur Neutralisierung hinzugefügt, erneut geschüttelt und zentrifugiert. Kontrollproben mit bidestilliertem Wasser wurden identisch behandelt, um mögliche Kontaminationen während der Probenaufbereitung zu erkennen.

10 Die so gewonnenen Nukleinsäuren konnten in den Amplifikations- und Hybridisierungs-experimenten eingesetzt werden.

Beispiel 3:

15 **Nachweis von Legionellen (Gattung und Spezies)**

Der Nachweis von Legionellen geschah durch erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikation unter Einbau von mit Digoxigenin markiertem dUTP. Die markierten Amplifikate wurden anschließend mittels der Reverse Dot-Blot-Technik (Kawasaki et al. Genetic analysis using polymerase chain reaction - amplified DNS and immobilized oligonucleotide probes: reverse dot-blot typing; in: Methods in Enzymology, Band 218, 1993) nachgewiesen.

20 1. Sonden-Herstellung (Tailing-Reaktion)
Boehringer Mannheim Terminal Transferase Kit 220-582
25 200 pmol Oligonukleotid
20 µl 5 x Reaktionspuffer
6 µl 25 mM CoCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM)
8 µl 10 mM dTTP (Gesamtmenge 80 nmol)
30 2,4 µl Terminal Transferase (60 U)
ddH₂O ad 100 µl
Gemisch eine Stunde bei 37°C inkubieren.

35 2. Polymerasenkettenreaktion (PCR) & Digoxigenin-Markierung der PCR-Produkte
PCR 25 µl Ansätze:
3,75 µl dNTPs (1 mM Konz)
1,25 Boehringer DIG DNS Labeling mixture
40 2,5 µl Perkin-Elmer Puffer I
je 0,75 µl Primer (Stammlösung 10 µM)
1 µl Taq Polymerase (Perkin-Elmer) (verdünnt 1 : 10)
H₂O ad 24 µl
45 1 µl DNS
Thermoprofil (Primer B & D; Perkin-Elmer 9600-Thermocycler)
95° - 3 Min.
95° - 30 Sek., 54° - 25 Sek., 72° - 30 Sek.: 30 Zyklen
72° - 5 Min.
herabkühlen auf 6°

50 3. Vorbereitung der Membranen
Boehringer Mannheim positively charged Nylon membranes in dünne Streifen schneiden. Mit Bleistift beschriften und mit abgeschnittener 1 ml-Pipettenspitze Kreise in die Membran "stampfen". 1 µl (2 pmol) Sonde auftragen, 10 Minuten lufttrocknen, mit 120 µl kreuzlinken (Stratalinker®, Stratagene).
Waschen der Membran (um nicht gebundene Sonde zu entfernen): (alle Streifen zusammen in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen)
Waschlösung: 5 x SSPE, 0,5 % SDS 30 Minuten bei 61°
55 Mit bidest. H₂O kurz waschen
lufttrocknen, Streifen können nach diesem Schritt bei -20° aufbewahrt werden.

EP 0 739 988 A1

4. Hybridisierung

Prähybridisierung - in einzelnen, numerierten Eppis (Eppendorf-Gefäß)

5 Lösung (je 300ml) 5 x SSPE
 0,5 % SDS
 0,5 % Dextranulfat

10 30 Min. bei 61°.
 Hybridisierung
 PCR-Produkt wird 10 Minuten bei 95° denaturiert und zügig nach Ende der Prähybridisierung zugegeben.
 Genau eine Stunde bei 61° bei sanfter Rotation hybridisieren lassen.
 Nach Abschluß der Hybridisierung werden die Membranen (im selben Eppendorf-Gefäß, mit jeweils 300 µl der folgenden Lösung) gewaschen:
15 2 x SSPE
 0,1 % SDS
 Waschschritte (unter leichtem Schütteln): zweimal 5 Min. bei Raumtemperatur und einmal 10 Min. bei 65°.

20 5. Detektion
 Alle Schritte werden unter ständigem leichten Schütteln in einem 50 ml Falcon-Röhrchen durchgeführt (Puffervolumen ca. 30 ml) (Boehringer Mannheim Katalog Nr. 117504)

25 a) 30 Min. D1-Puffer
 b) 30 Min. D2-Puffer
 c) 3 µl Antikörper-Konjugatlösung mit 30 ml frischem D2-Puffer vermischen, 30 Min. inkubieren
 d) 2 x 15 Min. D1-Puffer
 e) kurze Inkubierung in D3-Puffer
 f) Die Membranen werden mit der DNS-Seite nach oben in einer Klarsichthülle plaziert:
45 µl NBT

30 35 µl X-Phosphat-Lösung
 10 ml D3-Puffer
 g) Die Farblösung zugeben, die Membranen dabei nicht bewegen. Genau 15 Min. entwickeln.
 h) Stopplösung: D4-Puffer
 i) lufttrocknen

35

40

45

50

55

Puffer

5

| | | | |
|----|-----------|--|---|
| | 20 x SSPE | 3M NaCl 0,2 M Na ₂ H ₂ PO ₄ 20 mM EDTA | 175,3 g NaCl 27,6g Na ₂ H ₂ PO ₄ 7,4g EDTA |
| 10 | | pH auf 7,4 mit NaOH einstellen, aqua bidest. ad 1.000 ml | |
| | 2 x SDS | 20 g SDS pH auf 7,2 mit HCl (ein paar Tropfen) einstellen, aqua bidest ad 1.000 ml | |
| 15 | | D1 100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 0,3 % (w/v) Tween 20 | |
| 20 | | pH auf 7,5 bei 20° mit NaOH einstellen D2 1,0 % Blocking-Reagens (Kasein, Boehringer Kit), gelöst in D1, muß ca. eine Stunde vor Gebrauch hergestellt werden bzw. kann bei -20° aufbewahrt werden. | |
| 25 | | D3 100 mM TrisHCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ pH auf 9,5 bei 20° einstellen | |
| 30 | | D4 10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH auf 8,0 einstellen | |

35

6. PCR-Primer

| | | |
|-----------------------------------|------------|--------------|
| 18mer: 5'-GGCTGATTGTCTTGACCA-3' | (Primer B) | SEQ.ID.No. 2 |
| 20mer: 5'-AGGAAGCCTCACACTATCAT-3' | (Primer D) | SEQ.ID.No. 3 |
| 24mer: GTTGAAGACTACGACGTTGATAGG | (Primer A) | SEQ.ID.No. 4 |
| 21 mer: AATGTTTCACTTCTGAGTTCG | (Primer C) | SEQ.ID.No. 5 |

7. Oligonucleotidsonden (5S-rDNS):

Gattungssonde:

| | |
|--|--------------|
| 29mer: 5'-AACCACCTGATACCATCTCGAACTCAGAA-3' | SEQ.ID.No. 6 |
|--|--------------|

45

L. pneumophila-Speziessonde:

| | |
|--|--------------|
| 31mer: 5'-ACGTGAAACGTATCGTGAAACTCTGACTC-3' | SEQ.ID.No. 7 |
|--|--------------|

L. anisa-Speziessonde:

| | |
|---|--------------|
| 36mer: 5'-ATGCGAATACAAGATGTAGGTTGGGC-3' | SEQ.ID.No. 8 |
|---|--------------|

L. micdadei-Speziessonde:

| | |
|--|--------------|
| 34mer: 5'-ATGAAATTGCTCAGACAAATGAATACAGAGTTT-3' | SEQ.ID.No. 9 |
|--|--------------|

L. brunensis-Speziessonde:

| | |
|--|---------------|
| 31mer: 5'-CCTGTTTACAGAGCACTAACATGCTCT-3' | SEQ.ID.No. 10 |
|--|---------------|

L. cherrii-Speziessonde:

| | |
|---|---------------|
| 29mer: 5'-AATGCAAATACAAGAAATTAGGTTGGGC-3' | SEQ.ID.No. 11 |
|---|---------------|

55

L. cincinnattiensis-Speziessonde:

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| 27mer: 5'-CTCTCTTACCGGAAGTAACGCG-3' | SEQ.ID.No. 12 |
|-------------------------------------|---------------|

L. dumoffii-Speziessonde:

| | |
|--|---------------|
| 26mer: 5'-ATCAAACCTGGGGTAGGACACCTGC-3' | SEQ.ID.No. 13 |
|--|---------------|

L. erythra-Speziessonde:

EP 0 739 988 A1

24mer: 5'-AACCCGGGTAAGACCGGAAAAACC-3' SEQ.ID.No. 14
L. feeleii-Speziessonde:
27mer: 5'-GCAAAATGAAAGACAAATGCGTTGT-3' SEQ.ID.No. 15
L. israelensis-Speziessonde:
5 27mer: 5'-TTAACGCTTGATCAAACCCATT-3' SEQ.ID.No. 16
L. jordanis-Speziessonde:
27mer: 5'-TGATGAATGAATACCCCTAACATGGG-3' SEQ.ID.No. 17
L. longbeachae-Speziessonde:
10 39mer: 5'-TGCTTGATATAAGATATAATACCTCTTACCTGAG-3' SEQ.ID.No. 18
L. maceachernii-Speziessonde:
32mer: 5'-GGCAATACTTTAATTAAAGGCATTAATGCCTA-3' SEQ.ID.No. 19
L. moravica-Speziessonde:
23mer: 5'-AGGCCTTGGCTTGATTGAA-3' SEQ.ID.No. 20
L. sainthelensi-Speziessonde:
15 40mer: 5'-GTGCTGAATATAAGATATAATGTTACTCTCTTACCTGAG-3' SEQ.ID.No. 21
L. spiritensis-Speziessonde:
25mer: 5'-GTGTGCCCTGAAAGAACAGGGT-3' SEQ.ID.No. 22
L. steigerwaltii-Speziessonde:
28mer: 5'-AATGTGTATACAAAGCTGTAGGTTGCCA-3' SEQ.ID.No. 23
20 L. wadsworthii-Speziessonde:
30mer: 5'-GTACGTACGAATTAGAGATTGGCTAGGC-3' SEQ.ID.No. 24

8. Nachweisverfahren

25 a) Reverse dot-blot-Hybridisierung mit 4 verschiedenen Sonden
Gemäß obigem Arbeitsprotokoll wurden Nachweisverfahren unter Verwendung des gattungsspezifischen
Amplifikationsverfahrens und einer gattungs- (A) bzw. 3-speziespezifischen (B: L. pneumophila; C: L. anisa;
30 D: L. micdadei) Sonden durchgeführt. In Figur 2 ist die Farbentwicklung an 10 Filtern gezeigt. Es ist klar
erkenntlich, daß die genus-(gattungsspezifische) Sonde (A) in jedem Falle ein Nachweissignal liefert. Die L.
pneumophila-spezifische Sonde (B) reagiert nur mit dem Filter, der auch den Serovar 1, Philadelphia von L.
pneumophila enthält. Mit der L. anisa-spezifischen Sonde (C) ist im Filter Nr. 4 ein deutliches Signal sichtbar.
Die Spezies L. micdadei ließ sich mit der L. micdadei-spezifischen Sonde (D) nachweisen. L. gormanii konnte
mit der gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden (Filter Nr. 9).

Die Belegung der Filter mit nachzuweisenden Nukleinsäuren war folgende:

35 1: L. dumofii (2pmol probe)
2: L. anisa (2pmol probe)
3: L. anisa (4pmol probe)
4: L. anisa (8pmol probe)
40 5: L. micdadei ATCC 33218 (2pmol probe)
6: L. micdadei ATCC 33218 (4pmol probe)
7: L. micdadei L 5443/90 (2pmol probe)
8: L. micdadei L 5443/90 (4pmol probe)
9: L. gormanii
45 10: L. pneumophila sero 1 Philadelphia

Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region von Pneumophila und non-Pneumophila Spezies

50 In Figur 3, 4 und 5 ist das Ergebnis der Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region mit Hilfe der gattungsspezifischen Primer gemäß der vorliegenden Erfindung gezeigt. Es ist klar erkennlich, daß in jedem Fall eine Amplifikation stattfindet, wobei sich in vielen Fällen die Größe der Amplifikate der einzelnen Spezies unterscheidet. Über die Größe der Amplifikate ist daher eine Unterscheidung der Spezies von Legionella nach gattungsspezifischer Amplifikation möglich.

55 1: L. pneumophila sero 12 570-CO-H (FIG 3)
2: L. pneumophila sero 13
3: L. pneumophila sero 14 1169-MN-H
4: L. anisa WA-316-C3
5: L. brunensis
6: L. cherii ORW

7: L. cincinnatensis 72-OH-H
 8: L. dumofii NY-23
 9: L. erythra SE-32A-C8
 10: L. feeleii sero 1 WO-44C
 5 11: L. feeleii sero 2 691-WI-H
 12: L. israelensis Bercovier-4
 M: 100bp DNA size marker
 1: L. jordanis BL-540 (FIG 4)
 2: L. longeachae sero 1 Long Beach-4
 10 3: L. longeachae sero 2 Tucker-1
 4: L. maceachernii PX-1-G2-E2
 5: L. midwadei TATLOCK
 6: L. moravica 316-36
 7: L. oakridgensis OR-10
 15 8: L. rubrilucens WA-270-C2
 9: L. sainthelensi Mt. St. Helens-4
 10: L. spiritensis Mt. St. Helens-9
 11: L. steigerwaltii SC-18-C9
 12: L. wadsworthii 81-716A
 20 M: 100bp DNA size marker
 1: negative control (FIG 5)
 2: L. pneumophila sero 1 Philadelphia 1
 3: L. pneumophila sero 2 Togu-1
 25 4: L. pneumophila sero 3 Bloomington-2
 5: L. pneumophila sero 4 Los Angeles-1
 6: L. pneumophila sero 5 Dallas-1E
 7: L. pneumophila sero 6 Chicago-2
 8: L. pneumophila sero 7 Chicago-8
 30 9: L. pneumophila sero 8 Concord-3
 10: L. pneumophila sero 9 IN-23-G1-C2
 11: L. pneumophila sero 19 Leiden-1
 12: L. pneumophila sero 11 797-PA-H
 M: 100bp DNA size marker

35 Anstelle der in Beispiel 3 verwendeten Primer B und D können auch Primer eingesetzt werden, deren Hybridisierungspositionen auf SEQ. ID. NO. 1 abweichen. Im Folgenden sind konkrete Hybridisierungspositionen (erste Basenpaarung und Länge) von weiteren Primern angegeben. Auch bezüglich der gattungsspezifischen Sonde sind im Folgenden gleichfalls geeignete Sonden angegeben. Ebenfalls im Folgenden angegeben ist, welche Kombinationen der Primer für eine gattungsspezifische Amplifikation besonders geeignet sind.

Beispiel 4:

Variationsmöglichkeiten der Primer und Sonden

45 Primer

Primer B - Variationsmöglichkeiten

50 1) Pos. 104, 18mer, T_m 43,9° (Primer B aus Beispiel 3)
 2) Pos. 105, 21mer, T_m 43,0°
 3) Pos. 110, 22mer, T_m 42,8°
 4) Pos. 103, 18mer, T_m 43,9°
 5) Pos. 101, 19mer, T_m 42,7°
 55 6) Pos. 100, 19mer, T_m 43,5°
 7) Pos. 99, 20mer, T_m 44,2°
 8) Pos. 100, 20mer, T_m 45,0°
 9) Pos. 98, 20mer, T_m 43,5°
 10) Pos. 94, 21mer, T_m 43,1°

EP 0 739 988 A1

11) Pos. 104, 19mer, T_m 45,2°
12) Pos. 105, 23mer, T_m 46,1°
13) Pos. 113, 23mer, T_m 44,7°
14) Pos. 102, 19mer, T_m 46,3°
5 15) Pos. 100, 20mer, T_m 45,0°
16) Pos. 99, 21mer, T_m 45,6°
17) Pos. 98, 21mer, T_m 45,8°
18) Pos. 96, 22mer, T_m 45,5°
19) Pos. 105, 22mer, T_m 45,1°
10 20) Pos. 109, 23mer, T_m 44,0°

Primer D - Variationsmöglichkeiten

15 21) Pos. 316, 20mer, T_m 43,7° (Primer D aus Beispiel 3)
22) Pos. 312, 19mer, T_m 46,0°
23) Pos. 317, 20mer, T_m 44,9°

Primer A:

20 1) Pos. 34, 21mer, T_m 44,5°
2) Pos. 35, 22mer, T_m 45,4°
3) Pos. 37, 21mer, T_m 44,5°
4) Pos. 39, 20mer, T_m 44,6°
5) Pos. 38, 29mer, T_m 42,1°
25 6) Pos. 31, 18mer, T_m 43,1°
7) Pos. 29, 18mer, T_m 45,9°
8) Pos. 27, 18mer, T_m 43,2°
9) Pos. 25, 18mer, T_m 45,4°
10) Pos. 41, 19mer, T_m 43,8°
30

Primer C:

35 11) Pos. 286, 21mer, T_m 44,7°
12) Pos. 286, 20mer, T_m 42,4°
Variationsmöglichkeiten der 5S-Gattungssonde (nur für Primerkombination B/D)

40 Pos. 268, 29mer, T_m 61,0° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)
Pos. 269, 29mer, T_m 60,7°
Pos. 270, 29mer, T_m 60,7°
Pos. 271, 30mer, T_m 61,5°
Pos. 267, 29mer, T_m 61,4°
Pos. 265, 27mer, T_m 60,6°

45 23S Gattungssonde (nur für Primerkombination A/C geeignet)
5'-TTGTAGTAATTGGCTGATTGTCTTGACCATA-3' SEQ.ID.No. 25

Variationsmöglichkeiten der L-pneumophila Speziessonde (nur für Primerkombination B/D und A/C geeignet)

50 Pos. 162, 39mer, T_m 59,1° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)
Pos. 160, 32mer, T_m 59,3°
Pos. 163, 31mer, T_m 60,1°
Pos. 159, 33mer, T_m 59,4"

Die Positionsangaben (5'-terminale Base) beziehen sich auf die in FIG 1 abgebildete Sequenz, wobei Primer B und
55 A komplementär zu den Teilen der Sequenz von FIG 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen, und Primer D und C sequenzidentisch zu den Teilen der Sequenz von FIG 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen und sich strom-abwärts (von der Sequenz in FIG 1 aus gesehen) fortsetzen.

EP 0 739 988 A1

| Primerkombinationen | | |
|---------------------|------------|------------|
| | Primer B/D | Primer A/C |
| 5 | 1/21 | 1/11 |
| | 2/21 | 2/11 |
| 10 | 3/21 | 3/11 |
| | 5/21 | 4/11 |
| | 6/21 | 5/12 |
| | 7/21 | 6/12 |
| 15 | 9/21 | 7/11 |
| | 10/21 | 8/12 |
| | 11/22 | 9/11 |
| 20 | 12/22 | 10/11 |
| | 13/22 | |
| | 14/22 | |
| | 15/22 | |
| 25 | 16/22 | |
| | 17/22 | |
| | 18/22 | |
| 30 | 11/23 | |
| | 4/23 | |
| | 19/23 | |
| 35 | 20/23 | |
| | 8/23 | |
| | 17/23 | |

40 Alle angegebenen Primer und Nukleotidsequenzen sind DNS (Oligonukleotide im Falle der Primer und Sonden) linear, einzelsträngig.

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Sonden spezifisch für Legionella, d. h., sie besitzen keine Wirkung als Primer bzw. Nachweissonden für Organismen, die nicht zur Gattung Legionella gehören. Die Primerpaare B/D und A/C wurden als nicht wirksam gegenüber *Bacillus cereus*, *Brachamella catharrhalis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Cryptococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium africanum*, *avium*, *bovis*, *flavescens*, *fortuitum*, *gordanae*, *kansasii*, *terrae* and *xenops*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus*, *Salmonella enteridis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *milleri*, *pneumoniae* and *viridans* and β -hemolytic *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis* and *Vibrio cholerae* charakterisiert.

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

10

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhoferstr.116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: DE
- (F) POSTLEITZAHL: 68305
- (G) TELEFON: 0621 759 4348
- (H) TELEFAX: 0621 759 4457

15

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Gattungs- und speziesspezifische
20 Identifizierung von Legionellen

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 68
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

25

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

40

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Konsensussequenz"

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

50

| | |
|--|-----|
| GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACCGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTAAAC GTATCGTGT | 180 |
| AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAACCA | 240 |

55

EP 0 739 988 A1

GTTTTCTGG CGACTATAGC GATTTGAAAC CACCTGATAC CATCTGAAC TCAGAACTGA 300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

10

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

20

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

25

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

25

GGCTGATTGT CTTGACCA

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

30

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

40

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

45

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45

AGGAAGCCTC ACACATATCAT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

55

EP 0 739 988 A1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
5 (D) TOPOLOGIE: linear
(i) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
(ii) HYPOTHETISCH: NEIN
10 (iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:
15

GTTGAAGACT ACGACGTTGA TAGG

24

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
25 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
30 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella
35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AATGTTTCAC TTCTGAGTTC G

21

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
45 (B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
50 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA

55

EP 0 739 988 A1

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AACCACCTGA TACCATCTCG AACTCAGAA

29

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

15 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

20 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

25 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

30 ACGTGAAACG TATCGTGTAA ACTCTGACTC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

40 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

45 (iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella anisa

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATGCGAATAC AAGATGTAGG TTGCGC

26

55

EP 0 739 988 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella micdadei

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

20

ATGTAAATTG CTCAGACAAA TGAATACAGA GTTT

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCTGTTTTA CAGAGCACTT AACAAATGCTC T

31

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

55

EP 0 739 988 A1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
5 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella cherrii
10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

AATGCAAATA CAAGAAATTT AGGTTGGC

29

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
25 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella cincinnatensis
30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CTCTCTTTTT TTACCGGAAG TAACGCC

27

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
40 (B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
45 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
50 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella dumoffii
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

55

ATCAAATACCT GGGGTAGGAC ACCTGC

26

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
15 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella erythra
20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AACCCGGGTA AGACCGGAAA AACCC

24

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
30 (B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
35 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
40 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella feeleii
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

45 GCAAAATGA AAGACAAATG CGTTTGT 27

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid

55

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
5 (iii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
10 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella israelensis
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

15 TTAAACGCTT GTGAATCAA CCCATTC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:
20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
25 (D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
30 (iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella jordanis
35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TGATGAATGA ATATCCCTA ACATGGG

27

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 39 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
45 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
50 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA

55

EP 0 739 988 A1

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella longbeachae*

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

TGCTTGATAT AAGATATAAT ACCTCTTAT TTACCTGAG

39

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

15 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

20 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

25 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella maceachernii*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

30 GGCAATACCTT TAATTAAGG CATTAATGCC TA

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35 (A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

40 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

45 (iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella moravica*

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

AGGCCTTGGG CTTGTTGATT GAA

23

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5 (A) LÄNGE: 40 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

15 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella sainthelensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

20

G TGCTGAATA TAAGATATAA TGTTACTCTC TTTATTTACC

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

30 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella spiritensis

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

GTGTGCCCTG AAGAAGAAC AGGGT

25

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

50 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
5 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Legionella steigerwaltii
10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

AATGTGTATA CAAGCTGTAG GTTGGCCA

28

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
20 (B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
25 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
30 (A) ORGANISMUS: Legionella wadsworthii
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

GTACGTACGA ATTAGAGATT GGGTCTAGGC

30

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
40 (B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
45 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTISENSE: JA
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
50 (A) ORGANISMUS: Legionella
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

55

TTGTAGTAAT TGGCTGATTG TCTTGACCAT A

31

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

15 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Philadelphia-1

20 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Olphilia

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

| | |
|--|-----|
| GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCAGTAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| ATATAATCTG AGTAACCTCA GAATRTGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCGTGT | 180 |
| AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAACCAA TCAAACCCCTC AGGTAACCCA | 240 |
| GTTTCCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA | 300 |
| 30 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC | 336 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

40 (D) TOPOLOGIE: linear

(iii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

45 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Knoxville-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 02knox

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCAGTAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60

55

| | | |
|---|---|-----|
| 5 | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG ACTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGT | 180 |
| | AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT ATAATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA | 240 |
| | GTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA | 300 |
| | AACATTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC | 336 |

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 - (B) STAMM: Benidorm 030E
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 04beni
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

| | | |
|----|---|-----|
| 30 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCTGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG ACTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGT | 180 |
| | AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT ATAATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA | 240 |
| | GTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA | 300 |
| 35 | AACATTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC | 336 |

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 - (B) STAMM: France 5811
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 05fran

EP 0 739 988 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

5 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTRACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGAWAC GTATCGTGTAA 180
10 AACTCTGACT CTTTACCAAM CCTGTGGCTT AATAWGCCTA TYAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
 GTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
25 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: OLDA
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 06olda
30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

35 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGNNN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GATTATGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTAA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AACAYAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA 240
 GTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA 300
40 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 335 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

EP 0 739 988 A1

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*

5

(B) STAMM: Oxford 4032E

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 07oxfo

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

10

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| GCCTCCCTCA | AGATGAGTTT | TCCCCATGANN | NNCGTTGAAG | ACTACGACGT | TGATAGGCAA | 60 |
| GGTGTGGAAG | CGCAGTAATG | CGTGAAGCTA | ACTTGACTA | ATTGGCTGAT | TGTCTTGACC | 120 |
| ATATAATCTG | AGTGACTTCA | GAATGTGATT | TTGATTTGTA | TACGTGAAAC | GTATCGTGT | 180 |
| AACTCTGACT | CTTTACCAAA | CSTGTGGCTT | AATAATGCAA | TCAAGCCTCA | GGTAAACCAG | 240 |
| TTTTCCTGGC | GACTATAGCG | ATTGGAACC | ACCTGATACC | ATCTCGAATC | CAGAAGTGAA | 300 |
| ACATTTCCGC | GCCAATGATA | GTGTGAGGCT | TCCTC | | | 335 |

15

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

25

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*

40

(B) STAMM: Camperdown-1

45

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 08Camp

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|-----|
| GCCTCCCTCA | AGATGAGTTT | TCCCCATGAAG | CCCGTTGAAG | ACTACGACGT | TGATAGGCAA | 60 |
| GGTGTGGAAG | CGCAGTAATG | CGTGAAGCTA | ACTTGACTA | ATTGGCTGAT | TGTCTTGACC | 120 |
| ATATAATCTG | AGTGACTTCA | GATTATGATA | TTGATTTGTA | TACGTGAAAC | GTATCGTGT | 180 |
| AACTCTGACT | CTTTACCAAA | CCTGTGGCTT | AACATAGCAA | TCAAAGCCTC | AGGTAAATCCA | 240 |
| GTTCCTGGC | CGACTATAGC | GATTGGAAC | CACCTGATAC | CATCTCGAAC | TCAGAAGTGA | 300 |
| ACATTTCCGC | GCCAATGATA | GTGTGAGGCT | TCCTC | | | 336 |

45

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

55

(B) ART: Nucleotid

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- 5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 - 10 (B) STAMM: Togus-1
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 09tog
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

15 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACCTGATAA GTATCGTGTA 180
 20 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAAGCAA TMAAAGCCTC AGGTAAMCCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 - 30 (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- 35 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 - (B) STAMM: Bloomington-2
 - 40 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 10Bloom
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

45 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGANN NCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA 180
 50 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

15 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: Los Angeles-1
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 11sg41a

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

| | | |
|----|---|-----|
| 20 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTATAA TTGAATTGAA TACGTACAAAC GCATCGTGT | 180 |
| 25 | AACTCCGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAGTGTAA TCAAAGCCTC AGGTAACCA | 240 |
| | GTTCCTCGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA | 300 |
| | AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC | 336 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

40 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: Portland
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 12sg4po

45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

| | | |
|----|---|-----|
| 50 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG AGTAACATTCA GAATRTGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCGTGT | 180 |
| | AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAACCA | 240 |

55

EP 0 739 988 A1

5' GTTTCCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAAC CACCTGATAC CATCTGAAC TCAGAAAGTGA 300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

10

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

20

(B) STAMM: Dallas-1E

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 13sg5da

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

25

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAAG CCCGGTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
GGTGTGAAAG CGCAGTAATG YGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTATAA TTGAATTGAA TACGTACAAC GCATCGTGTA 180
AACTCCGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAGTGTAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
30 GTTTCCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAAC CACCTGATAC CATCTGAAC TCAGAAAGTGA 300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

40

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

45

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

50

(B) STAMM: Cambridge-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 14sg5cam

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAAG CCCGGTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60

55

EP 0 739 988 A1

5 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTAAAC GTATCGTGA 180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
GTTTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTGAAC TCAGAAAGTGA 300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

20 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Chicago-2
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 15sg6ch

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

30 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
ATATAATCTG AGTAACCTCA GAATATGATA TTGATTTGTA TACCTGATAM GTATCGTGA 180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
GTTTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTGAAC TCAGAAAGTGA 300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Chicago-8
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 16sg7

55

EP 0 739 988 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

5 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAAG CCCGGTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGAACCTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTAA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
10 GTTTCCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGA CTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

25 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Concord-3
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 17sg8

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

35 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAAG CCCGGTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGAACCTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTAA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA GAAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
 GTTTCCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA 300
40 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGT CTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

45 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare

 (B) ART: Nucleotid

 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

 (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

5

(B) STAMM: IN-23-G1-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 18sg9

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

10

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| GCCTCCCTCA | AGATGAGTTT | TCCCATGANN | NCCGTTGAAG | ACTACGACGT | TGATAGGCAA | 60 |
| GGTGTGAAAG | CGCAGTAATG | CGTGAAGCTA | ACTTGTACTA | ATTGGCTGAT | TGTCTTGACC | 120 |
| ATATAATCTG | AGTGAATTCA | GATTATGATA | TTGATTTGTA | TACGTGAAAC | GTATCGTGT | 180 |
| AACTCTGACT | CTTTACCAAA | CCTGTGGCTT | AAACATAGCAA | TCAAAGCCTC | AGGTAATCCA | 240 |
| GTTCCTCGG | CGACTATAGC | GATTGGAAC | CACCTGATAC | CATCTCGAAC | TCAGAAGTGA | 300 |
| AACATTTCCG | CGCCAATGAT | AGTGTGAGGC | TTCCTC | | | 336 |

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

25

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

30

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

35

(B) STAMM: Leiden-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 19sg10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

40

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| GCCTCCCTCA | AGATGAGTTT | TCCCATGNNN | NNCGTTGAAG | ACTACGACGT | TGATAGGCAA | 60 |
| GGTGTGAAAG | CGCAGTAATG | CGTGAAGCTA | ACTTGTACTA | ATTGGCTGAT | TGTCTTGACC | 120 |
| ATATAATCTG | AGTGAATTCA | GAATGTGATA | TTGATTTGTA | TACGTGAAAC | GTATCGTGT | 180 |
| AACTCTGACT | CTTTACCAAA | CCTGTGGCTT | AAAYAYAGCAA | TCAAAGCCTC | AGGTAACCCA | 240 |
| GTTCCTCGG | CGACTATAGC | GATTGGAAC | CACCTGATAC | CATCTCGAAC | TCAGAAGTGA | 300 |
| AACATTTCCG | CGCCAATGAT | AGTGTGAGGC | TTCCTC | | | 336 |

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

55

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 10 (B) STAMM: 797-PA-H
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 20sg11
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

15 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCAGTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACCTGAAAC GTATCGTGT 180
 20 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAATGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAMCCA 240
 GTTTTCCTGG CGMCTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 30 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 35 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: 570-CO-H
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 21sg12
 40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

45 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCAGNNN NNCGNNGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTAACATTCA GAATRTGATA TTGATTTGTA TACCTGATAM GTATCGTGT 180
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAACCCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA 300
 50 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

15 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: 82-A-3105
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 22sg13

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

| | | |
|----|---|-----|
| 20 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGT | 180 |
| | AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA | 240 |
| 25 | GTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA | 300 |
| | AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC | 336 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

| | | |
|----|---|-----|
| 30 | (i) SEQUENZKENNZEICHEN: | |
| | (A) LÄNGE: 336 Basenpaare | |
| | (B) ART: Nucleotid | |
| | (C) STRANGFORM: Einzelstrang | |
| 35 | (D) TOPOLOGIE: linear | |
| | (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA | |
| | (iii) HYPOTHETISCH: NEIN | |
| | (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: | |
| 40 | (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila | |
| | (B) STAMM: 1169-MN-H | |
| | (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 23sg14 | |
| 45 | (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47: | |
| | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| 50 | ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGT | 180 |
| | AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AAYAYAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA | 240 |
| | GTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA | 300 |

55

AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC

336

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 374 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

15 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella anisa

(B) STAMM: WA-316-C2

20 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 24ani

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| GAAGCCTCCC | TCAAGATGAG | TTTCCCATG | AAGCCGTTG | AAGACTACGA | CGTTGATAGG | 60 |
| 25 | CAAGGTGTGG | AAGCACAGTA | ATGTGTGAAG | CTAACTTGT | CTAATTGGCT | 120 |
| | ACCATATAAT | CTGAGTTACT | TCAGATTGTG | AATGCGAATA | CAAGATGTAG | 180 |
| | GGCTCAACCT | ACCCAGAACT | ACTTGAAACA | AAGTGTGAAC | TTCTTTATTT | 240 |
| | TGATTGAGGT | ATAATGCCTT | ACAATCAATG | CAAACCCAGT | TTTCCTGGCG | 300 |
| 30 | TTTGGAACCA | CCTGAATCCA | TCTCGAACTC | AGAAGTAAA | CGAACCCGCG | 360 |
| | TGTGAGGTTT | CCTC | | | | 374 |

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 350 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

40 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

45 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 50 | GCCTCCCTCA | AGATGAGTTT | TCCCATGAAG | CCCGTTGAAG | ACTACGACGT | TGATAGGCGA | 60 |
| | GGTGTGGAAG | CGCAGTAATG | TGTGAAGCTA | ACTCGTACTA | ATTGGCTGAT | TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAACCTG | AATGACTTCG | GGTTATGATA | GAAGATGATA | GATTATGCCG | TAAGGCAC | 180 |

55

EP 0 739 988 A1

5 GTGTTAACCC TTTTTACTT TACCAAGCCTG TTTTTACAGA GCACTTAACA ATGCTCTTA 240
TCAACAGGAC AACAGTTTC CTGGCGACCA TAGCGGTTG GAACCACCTG ACTCCATCTC 300
GAACTCAGTA GTGAAACAGA CCAGCGCCGA TGATACTGTG AGGCTTCCTC 350

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 317 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20 (A) ORGANISMUS: Legionella cincinnatensis

(B) STAMM: 72-OH-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 29cin

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

25 GCCTCCCTCA AGCTGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACCGACGT TGATAGGCAA 60
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
30 ATATAATCTG AGTTACTTCA GAGTGAAACA GAATATAAGT GACACCATGA CTCTCTTTRT 180
TTACCGGAAG TAACCGCGTC CAAGGCGCGC TACTCAAAAC AGTTTCCTG GCGACCATAG 240
CGGTTTGAA CCACCTGATT CCATCTCGAA CTCAGTAGTG AAACGAAACAT GCGCCAATGA 300
TAGTGTGAGG TTTCCTC 317

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:

40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 359 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

50 (A) ORGANISMUS: Legionella dumoffii

(B) STAMM: NY-23

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 31DUMO

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:

55

| | | |
|----|---|-----|
| 5 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGGAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGCAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG AGTTACTTCA GATGAACTGAA ATCAAATACCT GGGGTAGGAC ACCTGCCCCG | 180 |
| | AAATAAATAC AAAATAGTGT GTCCCTTTA TTACCTCGT GCATGATTGAG GGTATAATAT | 240 |
| | GCCCAATTGAA TCATGTCAAA CCAGTTTCC CGGCGACCAT AGCGGTTGG AACCACCTGA | 300 |
| 10 | ATCCATCTCG AACTCAGAAG TGAAACGAAC ATGCGCCAAT GATAGTGTGA GGCTTCCTC | 359 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 362 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella cherrii
- (B) STAMM: ORW
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 30che

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:

| | | |
|----|--|-----|
| 30 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CACAGTAATG TGTGCAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG AATTACTTCA GATTAACTGAA ATGAAATAC AAGAAATTAA GGTTGGGCCA | 180 |
| | CGGCCCAATC TGCAAAAAAA ATGTGTACTC TTTATTTACC TAACGCATGA TTGGGGTATA | 240 |
| 35 | ATGCGCCCAT TAATCATGTT AAACCAAGTTT TCCTGGCGAC CATAGCGGTT TGGAACCACC | 300 |
| | TGACTCCATC TCGAACTCAG AAGTGAAACG AACCCGCGCC AATGATAGTG TGAGGTTCC | 360 |
| | TC | 362 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 325 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella erythra

EP 0 739 988 A1

(B) STAMM: SE-32A-C8

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 32ERY

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGC 60
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACT 120
10 ATATAACCTG ATGCGCTTCA GGTTATATGG ATAACATGAA TGTGACTCTA TTTTTTACCG 180
GCCTCGTGGC CAACCCGGT AAGACCGGAA AAACCATGAT GCTTAAACCG TTTTCCTGGC 240
GACCATAGCA GTTTGGAACC ACCTGAATCC ATCTCGAACT CAGAAGTGAA ACAGACTCGC 300
GCCGATGATA GTGTGAGGCT TCCTC 325

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

20 (A) LÄNGE: 342 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

30 (A) ORGANISMUS: Legionella feeleii

(B) STAMM: WO-44C

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 33feel

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:

35 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGC 60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
ATATAACCTG AATTGCTTTG AGTTATAGG CAAAAATGAA AGACAAATGC GTTTGTGTTA 180
40 CCTCATAATC TTTACCGGCC TGCTGGCTGA GCACCTAACCTGCTTTATC CAGAACAGGC 240
AAACCCGTTT TCCTGGCGAC CATAACGGTT TGGAACCACC TGACTCCATC TCGAACTCAG 300
AACTGAAACA AACCCGCGCC GATGATACTG TGGAGTTCT CC 342

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 55:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 349 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

EP 0 739 988 A1

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

5 (A) ORGANISMUS: *Legionella feeleii*
(B) STAMM: 691-WI-H
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 34feel
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 55:

10
GGGGGAAGCC TCCCTCAAGA TGAGTTTCC CATGAAGCCC GTTGAAGACT ACGACGTTGA 60
TAGGCGAGGT GTGGAAGCGC AGTAATGCGT GAAGCTAACT CGTACTAATT GGCTGATTGT 120
CTTGACCATA TAACCTGAAT TGCTTGAGG TTATAGGCAA AAATGAAAGA CAAATGCGTT 180
15 TGTTTACCT CATAATCTT ACCGGCCTGC TGCGTGAGCA CTTAAACCTG CTTTATCCAG 240
AACAGGCAAA CCCGTTTCC TGGGACCAT AGCGGTTGG AACCACCTGA CTCCATCTCG 300
AACTCAGAAG TGAAACAAAC CCGGCCCAT GATAGTGTGG AGTTTCTCC 349

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 321 Basenpaare

25 (B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEÜLS: Genom-DNA

30 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella israelensis*
(B) STAMM: Bercovier-4

35 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 36isr
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 56:

40
GCCTTCCTCA AGATGAGTT TCCCTGAAG CCCGTTGAAG ACGACGACGT TGATAGGCGA 60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
ATATATCCTG AAATCATTCA GGGCATGATA CAAAATGAGT TTAAACGCTT GTGAATCAA 180
45 CCCATTCAAT CTTTACCTTC TGCCTCAAT AAGGCAGAAT AACCCGTTTT CCTGGCGACC 240
ATAGCTGTTT GGTACCACCT GATACCTTTC CGAACTCACT AGTAAACAA ACACGGCTG 300
ATGATAGTGT GGGGTCTCCC C 321

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 57:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 348 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

55

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 10 (A) ORGANISMUS: Legionella jordanis
 (B) STAMM: BL-540
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 38jor
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 57:

15 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCAGTAAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAACCTG AATGGCTTTT ATGTGGCAAG TCAAAGACAA GGCTTGGCAA GCTTGTGTTG 180
 20 CCCTAATATT TATCTTACG AGCTGTGATGA ATGAATATCC CCTAACATGG GTATTGCTC 240
 AGCAGGACAA CGTTTTTCCT GGCGACCATA GCGGTTGGA ACCACCTGAC TCCATCTCGA 300
 ACTCAGAAGT GAAACAGACC AGCGCCGATG ATAGTGTGAG GCTTCCTC 348

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 58:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 30 (A) LÄNGE: 312 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 40 (A) ORGANISMUS: Legionella longbeachae sero.1
 (B) STAMM: Long Beach-4
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 39long1
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 58:

45 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCAGTAAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTTACTTTA GATTATGCTT GATATAAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC 180
 50 TGAGTATCAT GCCAATAATG CGCGATACTC AAAACAGTTT TCCTGGGAC TATAGCGTT 240
 TGGAACCACC TGAATCCATC TCGAACTCAG AAGTGAAACG TACATGCC AATGATAGTG 300
 TGAGGCTTCC TC 312

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 59:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5 (A) LÄNGE: 312 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

15 (A) ORGANISMUS: Legionella lonbeachae sero.2

(B) STAMM: Tucker-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 401ong2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 59:

| | | |
|----|---|-----|
| 20 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG AGTTACTTTA GATTATGCTT GATATAAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC | 180 |
| 25 | TGAGTATCAT GCCAATAATG CGCGATACTC AAAACAGTTT TCCTGGCGAC TATAGCGGTT | 240 |
| | TGGAACCACC TGAATCCATC TCGAACTCAG AAGTGAACAG AACATGGGCC AATGATAGTG | 300 |
| | TGAGGCTTCC TC | 312 |

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 60:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 354 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

40 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella machaerarchernii

(B) STAMM: PX-1-G2-E2

45 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 41mac

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 60:

| | | |
|----|---|-----|
| 50 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGGAG ACTACGACGT TGATAGGCGA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CACAGTAATG TGTGTAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAACCTG AGCTGCTTT AGGTTGAAGA GTAAGTGATA AGGCAATACT TTAATTAAAG | 180 |
| | GCATTAATGC CTAAGCGTTT GTGTTAACCT CTAACCCCTT TACCAAGCTG ATTGGCGAAT | 240 |

EP 0 739 988 A1

AGGCCAATCG GTAAACCACT TTTCTGGCG ACCATAGCGG TTTGGAACCA CCTGAATCCA 300
TCTCGAACTC AGAACTGAAA CAGACCTGCG CCAATGATAG TGTGGGCTT CCCC 354

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 61:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 374 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20

(A) ORGANISMUS: Legionella micdadei

(B) STAMM: Tatlock

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 42micd

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 61:

25

GAAGCCTCCC TCAAGATGAG TTTTCCCAGT AAGCCCGTTG AAGACTACGA CGTTGATAGG 60
CGAGGTGTGG AAGCACAGTA ATGTGTGTAG CTAACTCGTA CTAATTGGCT GATTGTCTTG 120
ACCATATAAC CTGAACTGCC TTTAGGTTAT GAGTGAAGAA GCAAGGCAAT ATTGAATGAC 180
AGGGCAATGT AAATTGCTCA GACAAATGAA TACAGAGTTT GTGTTAACCT CTATCCACTT 240
TACCAAGCTG ATTGGTTAAT AGCCAATCG GTAAACCAGG TTTCTGGCG ACTATAGCGG 300
TTTGGAAACCA CCTGATCCCA TCTCGAACTC AGAAAGTGAAA CATACTGCG CCAATGATAG 360
TGTGGGCTT CCCC 374

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 340 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

45

(A) ORGANISMUS: Legionella moravica

50

(B) STAMM: 316-36

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 43monr

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 62:

55

| | | |
|----|---|-----|
| 5 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| | ATATAATCTG AGTTACTTCG CGTTATAGAA GTAGACGATA AAATAGAGTA GAATGTGTTA | 180 |
| | CCTCGAACATCT TTACCAGGCC TTGGGCTTGT TGATTGAACN CAATCATCAA TCTGAAGGTA | 240 |
| | AACAGTTTC CTGGCGACAA TAGCGGTTTG GAACCACCTG ATCCCACATCTC GAACTCAGAA | 300 |
| 10 | GTGAAACGAA CATCGGCCGA TGATAGTGTG AGGCTTCCTC | 340 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 63:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15 (A) LÄNGE: 302 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

25 (A) ORGANISMUS: Legionella oakridgensis

(B) STAMM: OR-10

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 44oak

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 63:

| | | |
|----|---|-----|
| 30 | AGCCTCCCTC GAGATGAGTT TTCCCATGAA GCCCGTTGAA GACGACGACG TTGATAGGCG | 60 |
| | AGGTGTGAA GCGTAGTAAT ACGTGAAGCT AACTCGTACT AATTGGCTGA TTGTCTTGAC | 120 |
| | CATATAACCT GAGTTGATTG AGGTTAACGC ATGCGTTGT GTATGCCTCA ATCTTTACCA | 180 |
| 35 | CTTGGAAAGCG TAAGCTTCCA ATACCGTTTT TCCTGGCGAC CATAGCCGTT TGGAACCACCC | 240 |
| | TGATACCATC CCGAACTCG AAGTGAACG AACGGCGGCC AATGATAGTG TGGGGCTTCC | 300 |
| | CC | 302 |

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 64:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

45 (A) LÄNGE: 323 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

50 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella rubrilucens

EP 0 739 988 A1

(B) STAMM: WA-270A-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 45rub

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 64:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCA 60
GGTGTGAAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
10 ATATAACCTG ATACGCTTCA GGTTATAGCA ATAACATGAA TGTGACTCTA TTYTTTACCG 180
GCCTCATGGC CAGCGGTTAA CACCGTTGCC ACCATGACGC TTAAACCGTT TTCCCTGGCA 240
CCATAGCAGT CTGGAACAC CTGAATCCAT CTCGAACTCA GAACTGAAAC AGACTCGCGC 300
15 CGATGATAGT GTGAGGTTTC CTC 323

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 65:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 316 Basenpaare

20 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella sainthelensis

30 (B) STAMM: Mt.St. Helens-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 46saint

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 65:

35 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
GGTGTGAAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
ATATAATCTG AGTTACTTCA GATTGTGCTG AATATAAGAT ATAATGTTAC TCTCTTTATT 180
40 TACCTGAGTA TCATGCGGCT AATGCACGAT ACTCAAAACA GTTTCCCTGG CGACCATAGC 240
GGTTTGGTAC CACCTGATTC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA AACGACATG CGCCAATGAT 300
AGTGTGAGGC TTCCCTC 316

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 66:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 350 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

50 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella spiritensis*

(B) STAMM: Mt. St. Helens-9

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 47spir

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 66:

10

| | |
|---|-----|
| GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCAGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGGA | 60 |
| GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTM ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| ATATAACCTG AATCACTTCG GGTTATTGAT ACCAAAGATA CGAAAAGAAG CAAGAACGAT | 180 |
| TGTGTTACCG AATATCTCTT TACCAAGCTG TGGTGTGCC TGAAGAAGAA ACAGGGTTAC | 240 |
| GACTCAGGAT AACCGTTTC CTGGCGATTA TAGCCGTGTG GAACCACCTG ATTCCATCTC | 300 |
| GAACTCAGAA GTGAAACGCA CGTACGCCGA TGATAGTGTG GGGTCTCCCC | 350 |

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 360 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella steigerwaltii*

(B) STAMM: SC-18-C9

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 48steig

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 67:

| | |
|--|-----|
| GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCAGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| GGTGTGGAAG CGCGAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| ATATAATCTG AATTACTTCA GAGTGACTGA ATGTGTATAC AAGCTGTAGG TTGGCCAAGG | 180 |
| CACAAACCTAC AGAAATAAAAT TGTGAACCTT TTATTACCT AATGCATGAT TCGGGTATAA | 240 |
| TACGCCAAC ATCATGTAAA ACCAGTTTC CTGGCGACCA TAGCCGTTTG GAACCACCTG | 300 |
| ACTCCATCTC GAACTCAGAA GTGAAACAGA CCCGCGCCAA TGATAGTGTG AGGTTTCCTC | 360 |

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 68:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 366 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

55

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 10 (A) ORGANISMUS: Legionella wadsworthii
 (B) STAMM: 81-716A
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 49wad
 15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 68:

| | | |
|----|---|-----|
| 15 | GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA | 60 |
| | GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC | 120 |
| 20 | ATATAATCTG AGTTACTTCA GGTTAACTGA TAAGTACGTA CGAATTAGAG ATTGGGTCTA | 180 |
| | GGCCCAATCT AAAAAAAATA AAAAAATGTC AACCTTTTTA TTTACCTATA GCATGATTAG | 240 |
| | GGTATAATAC GCCCAATTCA TGCGAAACCA GTTTTCCTGG CGACAATAGC GGCTTGGAAC | 300 |
| 25 | CACCTGATCC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA AACGAGCATG CGCCAATGAT AGTGTGAGGT | 360 |
| | CTCCTC | 366 |

30 **Patentansprüche**

1. Verfahren zur gattungsspezifischen Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung Legionella, dadurch gekennzeichnet, daß mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung Legionella amplifiziert werden.
2. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella in einer Probe gekennzeichnet durch
 - gattungsspezifische Amplifikation von Nukleinsäuren aller in der Probe vorhandenen Spezies der Gattung Legionella unter Verwendung eines Legionella-gattungsspezifischen Sets von wenigstens 7 Primern und
 - Nachweis einer oder mehrerer Spezies der Gattung Legionella aufgrund der Amplifikate.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Spezies aufgrund der unterschiedlichen Größe der Amplifikate differenziert wird.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit einer gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe speziesspezifischer Sonden auf die Anwesenheit von Legionella-Spezies untersucht werden.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe von Legionella-Untergruppen spezifischer Sonden auf die Anwesenheit von Legionella-Untergruppen untersucht werden.
- 55 7. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter gattungsspezifischer Amplifikation eines Teilstückes der Nukleinsäuresequenz der Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilstück sowohl Teile der 23S-Region und der 5S-Region, als auch die dazwischen liegende Spacerregion umfaßt.

EP 0 739 988 A1

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation unter Verwendung zweier Primer durchgeführt wird, von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region hybridisiert.
- 5 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Primersequenzen Sequenzen enthalten, die ausgewählt sind aus mindestens 15 Basen langen Sequenzen, die zumindestens 90 % homolog mit oder komplementär zu Teilsequenzen der SEQ. ID. No. 1 sind.
10. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zumindestens 90 % homolog zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist, oder die zumindestens 90 % komplementär zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist.
- 15 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde keine weiteren Legionella-spezifischen Sequenzen aufweist, die mehr als 15 Basen lang sind.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß vor Verwendung der Nukleinsäuresonde ein Amplifikationsverfahren gemäß Anspruch 9 durchgeführt wird und die Sonde mit einem Strang des amplifizierten Teilstückes hybridisieren kann.
- 20 13. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, dadurch gekennzeichnet, daß die Summe aller möglichen Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen wird.
14. Nukleinsäuresonde zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, welche zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist, oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist.
- 25 15. Sonde gemäß Anspruch 14 dadurch gekennzeichnet, daß sie gattungsspezifisch ist.
- 30 16. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil von SEQ. ID. No. 1 zwischen den Positionen 94 und 126 oder 25 und 67 liegt.
17. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 94 und 126 oder 25 und 67 einschließt.
- 35 18. Paar von Primern zur gattungsspezifischen Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert.
- 40 19. Doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-RNS und 23-RNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-RNS und 23S-RNS, die im Genom direkt an die Spacerregion anschließen, dadurch gekennzeichnet, daß sie höchstens 371 bp lang ist.
20. Reagenzkit zur gattungsspezifischen Amplifikation und zum speziespezifischen Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend
 - ein gattungsspezifisches Set von weniger als 7 Primern und
 - mindestens eine Legionella-speziespezifische Nachweis-Sonde.

50

55

Fig. 1

1: GCCTCCCTCAAGATGAGTTTCCCATGAAGCCCGTTGAAGACTACGACGT

51: TGATAGGCAAGGTGTGGAAGCGCAGTAATGCGTGAAGCTAACTTGTACTA

23S/Spacer

101: ATTGGCTGATTGTCTTGACCATATAATCTGAGTGACTTCAGAA/TGTGATA

151: TTGATTTGTATACGTGAAACGTATCGTGTAAACTCTGACTCTTACCAAA

Spacer/5S

201: CCTGTGGCTTAATATAGCAATCAAAGCCTCAGGTAAACCAGTT/TCCTGG

251: CGACTATAGCGATTGGAACCACCTGATACCATCTCGAACTCAGAAGTGA

301: AACATTTCCCGGCCAATGATAGTGTGAGGCCTCCTC

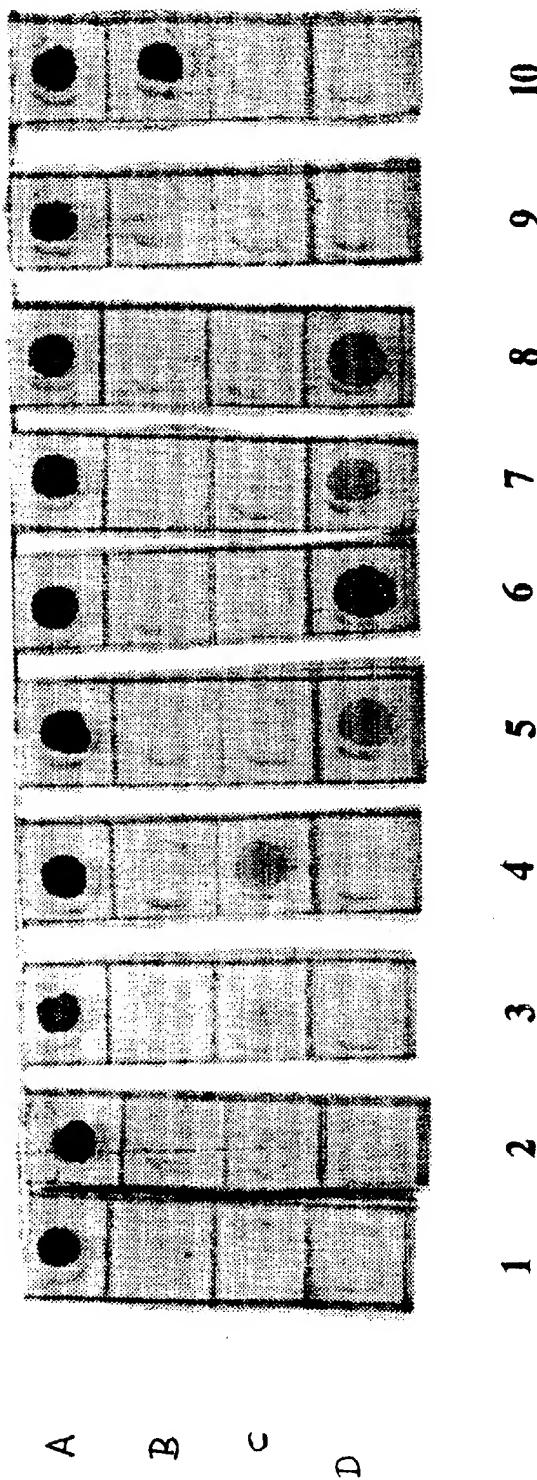


FIG 3

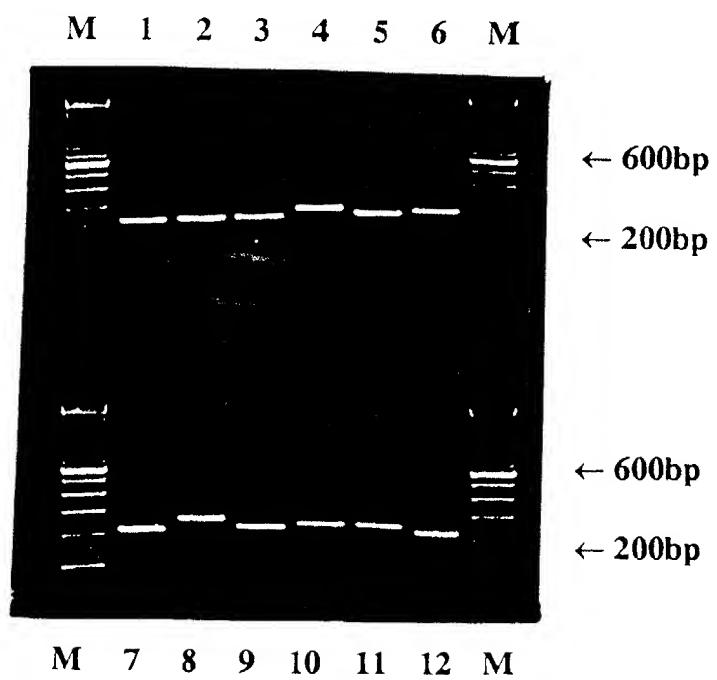


FIG 4

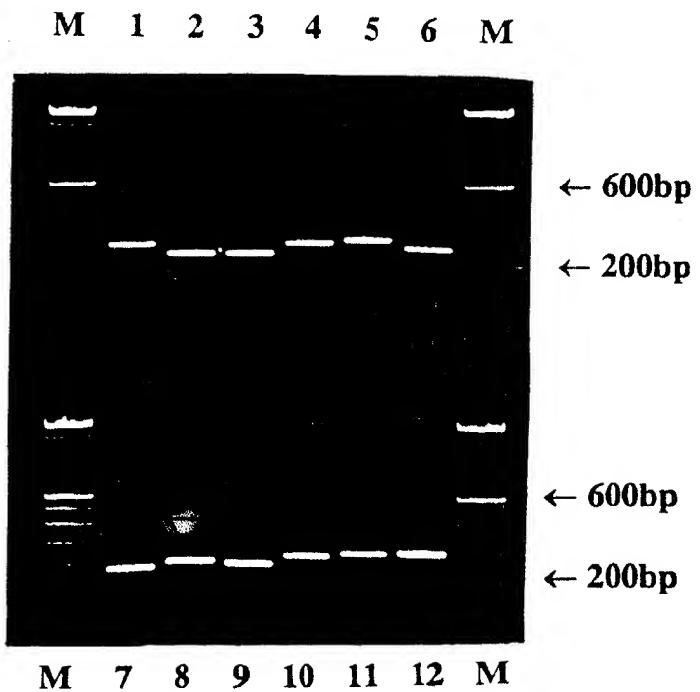
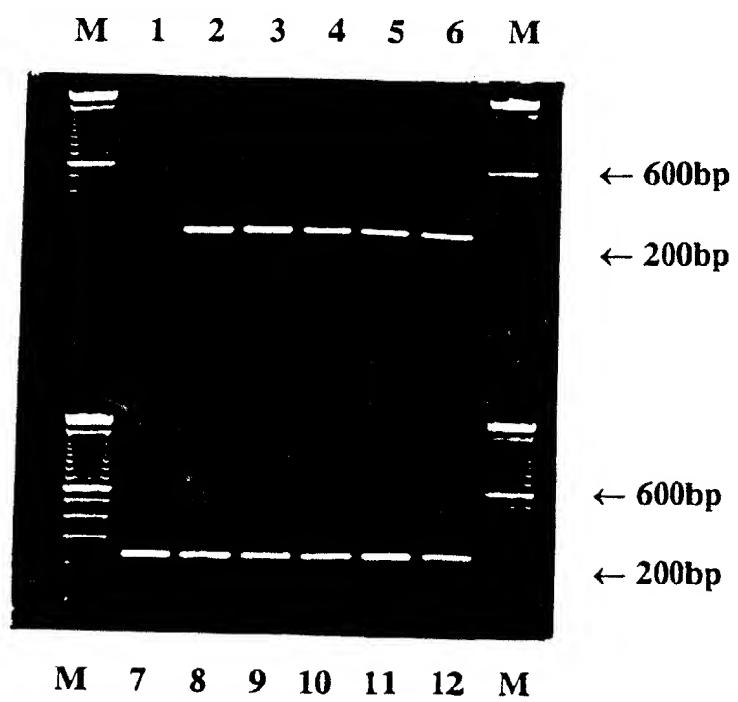


FIG 5





| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|--|---|---|---|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betreff Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6) |
| X | MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, Bd. 8, Nr. 1, Februar 1994, Seiten 11-14, XP000578308 MAIWALD M ET AL: "Characterization of contaminating DNA in Taq polymerase which occurs during amplification with a primer set for Legionella 5S ribosomal RNA" * das ganze Dokument * | 1,2 | C12Q1/68 C12P19/34 C07H21/04 |
| Y | --- | 3-20 | |
| X | J.CLIN. MICROBIOL., Bd. 32, Nr. 6, Juni 1994, Seiten 1503-5, XP000579096 MATSIOTA-BERNARD P ET AL: "Evaluation of commercial amplification kit for detection of Legionella pneumophila in clinical specimens" | 1,2 | |
| Y | * Seite 1504, Zeile 4 - Zeile 13 * | 3-20 | |
| X | CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOL., Bd. 40, Nr. 6, Juni 1994, Seiten 495-9, XP000579140 OSHIRO R ET AL: "modification of reagents in the EnviroAmpTm kit to increase recovery of Legionella organisms in water " | 1,2 | |
| Y | * das ganze Dokument * | 3-20 | |
| X | J. CLIN. MICROBIOL., Bd. 31, Nr. 12, Dezember 1993, Seiten 3325-28, XP000579097 KESSLER, H. ET AL.: "Rapid detection of Legionella species in Bronchoaveolar lavage fluids with the EnviroAmp Leginella PCR amplification and detection kit" | 1,2 | |
| Y | * das ganze Dokument * | 3-20 | |
| | --- | -/-- | |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt | | | |
| Recherchenort | Abschlußdatum der Recherche | Prüfer | |
| DEN HAAG | 19. August 1996 | Horne, H | |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE | | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | |
| X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : handschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur | | | |



Europäisches Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
P 96 10 6728

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | | | |
|---|--|------------------|---|--|--|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betreff Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6) | | |
| X | KLI. LABOR., Bd. 40, Nr. 3, 1994, Seiten 211-16, XP000579246 HEIDRICH B ET AL: "Genetische Verwandtschaft innerhalb des Genus Legionalla DNS Sequenzuntersuchung an ribosomalen Genen" * das ganze Dokument * --- | 1,2 | | | |
| X | EUR. J. MICROBIOL. INFECT. DIS.I, Bd. 13, Nr. 3, März 1994, Seiten 225-31, XP000579208 LISBY G ET AL: "Construction of a DNA amplification assay for the detection of Legionella species in clinical samples" * das ganze Dokument * | 1,2 | | | |
| Y | | 3-20 | | | |
| Y | MED MICROBIOL LETT, Bd. 3, Nr. 6, 1994, Seiten 279-90, XP000579098 HEIDRICH B ET AL: "Automated direct sequencing of Legionella 5S rRNA" * das ganze Dokument * | 3-20 | | | |
| Y | WO-A-92 11273 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) * das ganze Dokument * | 3-20 | | | |
| A | WO-A-94 28174 (AMACO CORPORATION) * das ganze Dokument * | 1-20 | | | |
| | | | RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.6) | | |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt | | | | | |
| Recherchenart | Abschlußdatum der Recherche | Prüfer | | | |
| DEN HAAG | 19. August 1996 | Osborne, H | | | |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE | | | | | |
| X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze | | | | |
| Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie | E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist | | | | |
| A : technologischer Hintergrund | D : in der Anmeldung angeführtes Dokument | | | | |
| O : nichtschriftliche Offenbarung | L : aus andern Gründen angeführtes Dokument | | | | |
| P : Zwischenliteratur | & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | | | | |